بررسی اثر ویتامین D_3 در ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

قاسم مسیبی[1]، علی قضاوی[2]، حسین صالحی[3]

1- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه ایمنی شناسی

2- مربی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه ایمنی شناسی

3- مربی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه بافت شناسی

یافته / دوره هشتم / شماره 3 / پاییز 85 / مسلسل 29

چکیده

دریافت مقاله: 85/2/25، ***پذیرش مقاله***: 85/6/6

Ø مقدمه: در بیماریهایی مثل مولتیپل اسکلروزیس و آنسفالومیلیت خودایمن تجربی ارتشاح لکوسیتی به داخل سیستم عصبی مرکزی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری مؤثر می باشد. برخی بررسی ها نشان می دهد که تجویز ویتامینD_3 (فرم فعال ویتامین D) به موشهای مبتلا به EAE، شدت بیماری را تعدیل می کند. هدف از این مطالعه، بررسی کار آمدی ویتامین D_3 در مهار EAE، اثر ویتامین D_3 روی میزان ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به EAE مورد مطالعه می باشد.

Ø مواد و روش ها: موش های نر نژاد C57BL/6 در دو گروه درمانی (هر گروه 8 رأس) با شرایط سنی و وزنی مشابه قرار گرفتند. موش های گروه مطالعه (مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D_3) یک روز در میان 5 میکروگرم ویتامین D_3 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی از سه روز قبل تا 19 روز پس از ایجاد بیماری دریافت کردند. موش های گروه شاهد (مبتلا به EAE درمان نشده) تنها حلال ویتامین را با همان جدول زمانی دریافت نمودند. همچنین 5 رأس موش نر نژاد C57BL/6 با شرایط سنی و وزنی مشابه به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شد.

Ø یافته ها: نتایج نشان داد که شدت علائم کلینیکی در موش های تحت درمان با ویتامین D_3 (3/2±0/8) در مقایسه با گروه درمان نشده(5/3±0/44) بطور معنی داری کمتر می باشد ($p<0/001$). همچنین اختلاف معنی داری در تعداد سلولهای ارتشاح یافته به مغز، بین موشهای مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D_3 و درمان نشده مشاهده شد ($p<0/01$).

Ø بحث و نتیجه گیری: این نتایج مشخص می نماید که درمان با ویتامین D_3 موجب کاهش ارتشاح لکوسیت ها به مغز موشهای مبتلا به EAE شده و سبب کاهش ضایعات پاتولوژیک و علائم کلینیکی و تعدیل بیماری می گردد. لذا ویتامین D_3 ممکن است در درمان بیماریهای التهابی همراه با ارتشاح سلولی به داخل بافت، مفید باشد.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی، ویتامین D_3، ارتشاح لکوسیتی، موش نژاد C57BL/6

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی، کد پستی 38481

پست الکترونیک: gmosayebi@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس[1] از دسته بیماریهای خود ایمن التهابی است که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می کند (1). علامت بارز و مشخص پاتولوژی بیماری، وجود پلاکهای متعدد می باشد که در ماده سفید مغز به دلیل تخریب میلین ظاهر می گردد. علت ایجاد پلاکهای مغزی، ارتشاح لنفوسیتها و ماکروفاژها به مغز و ایجاد واکنش التهابی می باشد. علائم و نشانه های عصبی در بیماران، به وسعت و محل پلاک بستگی دارد (2، 3). هر عاملی که مانع از ارتشاح سلولی به مغز گردد یا میزان ارتشاح را کاهش دهد، می تواند از پیشرفت بیماری جلوگیری کند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد در مناطقی که غذاهای سرشار از ویتامین D_3 مصرف می کنند یا در معرض بیشتر با نور خورشید قرار دارند، شیوع مولتیپل اسکلروزیس کمتر است (6-4).

مطالعات انجام شده بر روی آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی[2] (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) نیز نشان می دهد که ویتامین D_3 از پیشرفت بیماری جلوگیری می کند(7، 8). چگونگی مهار آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی توسط ویتامین D_3 مشخص نیست. پاره ای مطالعات نشان می دهد که ویتامین D_3 با اثر ایمونومدولاتوری موجب مهار پاسخهای ایمنی می شود (9، 10). اسپچ[3] و همکاران نشان دادند که ویتامین D_3 از طریق القا آپوپتوز در سلولهای التهابی از پیشرفت بیماری جلوگیری می کند (11). ویتامین D_3 ممکن است به عنوان یک تنظیم کننده فاکتور های نسخه برداری عمل کند و با مهار تولید سیتوکاینهای التهابی سبب کاهش شدت بیماری گردد(12، 13). در هر صورت در خصوص عملکرد ویتامین D_3 در مهار بیماری مکانیسم های متعددی را مطرح می کنند. این احتمال وجود دارد که ویتامین D_3 با جلوگیری از ارتشاح سلولی بتواند در مهار بیماری مؤثر باشد. براین اساس در مطالعه حاضر اثر ویتامین D_3 بر میزان ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی به عنوان مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی که به صورت موردی ـ شاهدی انجام شده، جامعه مورد مطالعه، موشهای نر خالص[4] نژاد C57BL/6 با محدوده سنی 6 تا 8 هفته بودند که از مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شدند.

القا EAE:

مقدار 200 میکروگرم پپتید MOG35-55 با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K) و درجه خلوص بیشتر از 95% (شرکت فارما 2، روسیه)، در 100 میکرولیتر بافر فسفات سالین و 100 میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (سیگما3)، مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت به هر موش C57BL/6 تزریق گردید. مقدار 400 نانوگرم سم سیاه سرفه (سیگما) در حجم400-300 میکرولیتر بافر فسفات در مرحله صفر و 48 ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تجویز شد (14). جهت گروه کنترل نیز مراحل فوق اعمال شد با این تفاوت که به آنها پپتید MOG35-55 تجویز نشد. روند بیماری و تغییرات وزن موشها روزانه مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری از صفر(عدم ابتلا به بیماری)، یک(اختلال در حرکت دم)، دو(فلج شدن دم)، سه(اختلال در راه رفتن)، چهار(فلجی یک پا)، پنج (فلجی هر دو پا)، شش(فلجی کامل دست و پا) تا هفت(مرگ) درجه بندی شد (15).

درمان موشهای مبتلا به EAE با ویتامین D3

جهت تأثیر ویتامین D_3 بر روند بیماری EAE، از موشهای نر نژاد C57BL/6 (8-6 هفته ای) استفاده شد. 16 رأس موش سه روز قبل از ایجاد بیماری، به 2 گروه (در هر

1. Multiple sclerosis
2. experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)
3. Spach
4. inbred

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

گروه 8 رأس) با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم بندی شدند و به صورت زیر تا روز نوزدهم پس از ایجاد EAE، تحت درمان قرار گرفتند. گروه مطالعه: موشهای مبتلا به EAE که به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، 5 میکروگرم ویتامین D_3 در 150 میکرولیتر روغن کنجد هر دو روز یک بار به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد: موشهای مبتلا به EAE که به هر موش 150 میکرو لیتر روغن کنجد هر دو روز یک بار به صورت داخل صفاقی تجویز شد. در ضمن 5 رأس موش که از نظر جنس، نژاد، سن و وزن با دو گروه مذکور مشابه بودند به عنوان موشهای سالم غیر بیمار در نظر گرفته شد که تنها روغن کنجد دریافت نمودند. انتخاب دوز تزریقی ویتامین در این مطالعه بر اساس مطالعات مشابهی بود که از این ویتامین جهت درمان بیماریها در مدلهای حیوانی استفاده شده است (16).

تهیه برشهای مغزی و بررسی ارتشاح سلولی:

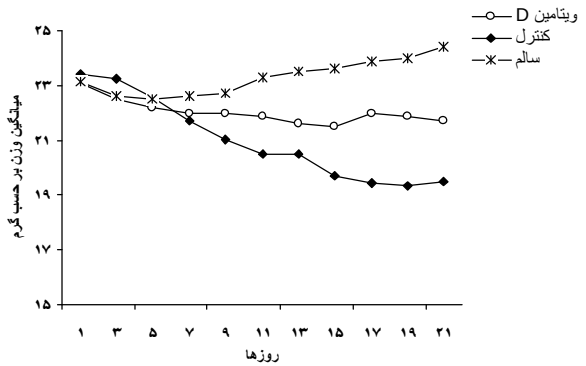
پس از گذشت بیست روز از زمان ایجاد EAE، مغز حیوانات (5 رأس از هر گروه) خارج و در محلول فرمالین بافره خنثی 10 درصد قرار گرفت. پس از 48 ساعت، با برش ساژیتال مغز به دوقسمت تقسیم شد. نیمکره چپ هر موش مجدداً در فیکساتور گذاشته شد. با توجه به اینکه اختلالات با درگیری اندام های حرکتی سمت راست همراه بود، نیمکره سمت چپ جهت مطالعه مناسب تر می باشد. سپس نمونه ها در داخل دستگاه فراهم آورنده بافت[1] (مدل DS2000/H) قرار داده شده تا پاساژ بافتی صورت گیرد. پس از پاساژ بلوک های پارافینی تهیه شد. نمونه های بافتی در جهت طولی، به طوری که محل برش ساژیتال به طرف پایین باشد، داخل بلوک قرار گرفتند. با استفاده از میکروتوم (مدل 4055) از نمونه ها، برشهای با ضخامت 8 میکرونی تهیه گردید و به فاصله هر ده برش، یک برش انتخاب شد. برای هر نمونه 12 برش و در هر گروه مجموعاً 60 برش تهیه شد. این برشها طولی (ساژیتال) تهیه شد تا حواشی بطن های طرفی در برش نشان داده شود، زیرا بیشتر پلاک ها و ارتشاح لکوسیتی در اطراف بطن های طرفی دیده می شود (17). نمونه ها با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و از نظر تعداد محل های ارتشاح و شدت ارتشاح لکوسیتی با استفاده از میکروسکوپ نیکن –مدل لاب فوت دو[2] مورد بررسی قرار گرفتند (18).

آنالیز آماری:

جهت مقایسه میانگین ها (میانگین وزن و شدت بیماری و تعداد سلولهای ارتشاحی) از روش غیر پارامتریک من ویتنی[3] استفاده شد. از آزمون فریدمن[4] به منظور بررسی تغییرات شدت بیماری در هر گروه و برای مقایسه وزن در روزهای مختلف نیز از روش اندازه گیری تکراری[5] استفاده گردید. $p<0/05$ به عنوان سطح معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

با بررسی تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای سالم مشخص گردید که میانگین وزن موشهای مبتلا به EAE در مقایسه با موشهای سالم بطور معنی داری کمتر است ($p<0/001$). با مقایسه میانگین تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای تحت درمان با ویتامین D_3 مشخص گردید که موشهای تحت درمان با ویتامین D_3 کاهش وزن کمتری در مقایسه با گروه درمان نشده داشتند (نمودار 1).



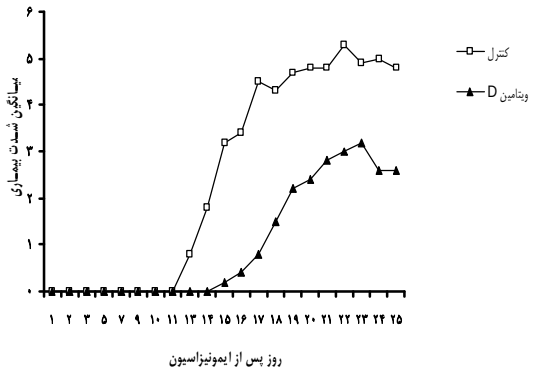
نمودار شماره 1ـ مقایسه میانگین تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D_3 و موشهای سالم

1. Tissue Processor
2. Nikon-Model labphot-2
3. Mann Whitney-U
4. Friedman
5. Repeated measurement

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

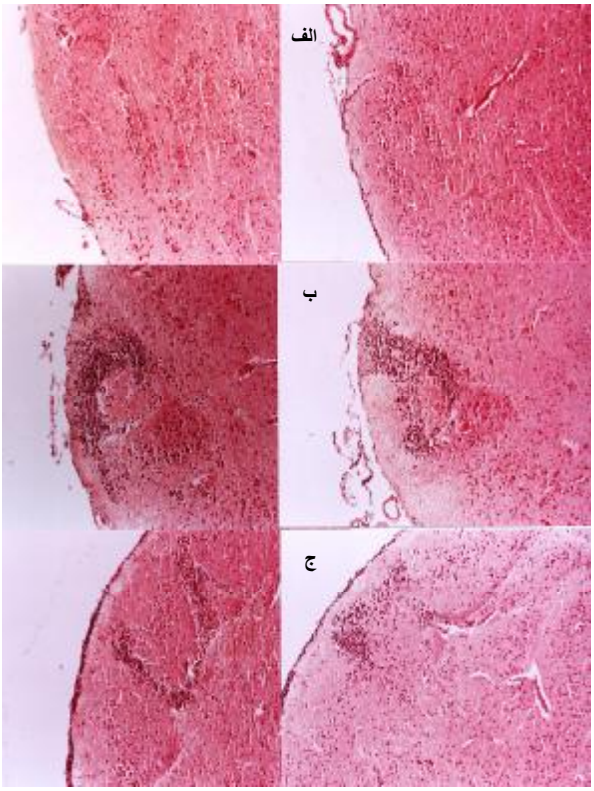
با بررسی روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری مشخص گردید که بین روز شروع بیماری در گروههای درمان نشده و درمان شده تفاوت قابل توجه ای وجود دارد. روز شروع بیماری در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده 11 روز پس از زمان ایجاد EAE بود در حالی که در موشهای تحت درمان با ویتامین D_3 ، زمان شروع علائم 15 روز پس از القا EAE بود (نمودار 2).

با مقایسه میانگین حداکثر شدت بیماری در گروههای مختلف مشخص شد که میانگین حداکثر شدت بیماری در موشهای تحت درمان با ویتامینD_3 (3/2±0/8) در مقایسه با موشهای مبتلا بهEAE درمان نشده (5/3±0/44) به طور معنی داری کمتر می باشد (p<0/001) (نمودار 2).



نمودار شماره 2ـ مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D_3

بررسی برشهای مغزی از نظر میزان ارتشاح لکوسیتی نشان داد که میانگین تعداد مکانهای ارتشاح سلولی در موشهای مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D_3 در مقایسه با گروه درمان نشده بطور قابل توجهی کمتر بود (شکل 1). همچنین با شمارش تقریبی سلولهای ارتشاح یافته در محلهای ارتشاح مشخص گردید که میانگین تعداد سلولها در محل ارتشاح در موشهای مبتلا به EAE درمان شده (63±13) در مقایسه با گروه درمان نشده (120±20) کمتر است (p<0/01).



شکل شماره 1ـ مقایسه ارتشاح سلولی در مغز موشهای سالم (الف) و موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین (ج). برشها با قطر 8 میکرون از مغز تهیه گردید. نمونه ها با روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی و با بزرگنمایی (10´10) بررسی شدند

بحث و نتیجه گیری

بیماری مولتیپل اسکلروزیس و آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) از دسته بیماریهای التهابی هستند که با ارتشاح لکوسیتی به بافت مغز و نخاع همراه است. سلولهای ارتشاح یافته به بافت مغزی موجب ایجاد واکنشهای التهابی در بافت مغزی شده و سبب تخریب میلین می شوند. شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلولی بستگی دارد(3-1).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ویتامین D_3 به موش های مبتلا به EAE باعث کاهش شدت علائم کلینیکی بیماری می گردد. همچنین در این گروه مرحله شروع یا حمله بیماری در مقایسه با گروه کنترل (درمان نشده) با تأخیر همراه

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

است. با بررسی برشهای مغزی نیز مشخص گردید که تعداد مکانهای ارتشاح و همچنین تعداد سلولهای ارتشاح یافته به مغز در موشهای که تحت درمان با ویتامین D_3 قرار داشتند به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه درمان نشده کمتر است. این نتایج نشان داد که بین شدت بیماری و میزان ارتشاح سلولی ارتباط وجود دارد. علت کاهش ارتشاح سلولی به مغز موشهای مبتلا به EAE که تحت درمان با ویتامین D_3 بودند، مشخص نیست.

یافته های قبلی نشان می دهد که ویتامین D_3 در تعدیل پاسخهای ایمنی نقش دارد (19). ویتامین D_3 ممکن است با مهار تولید سیتوکاین های التهابی باعث کاهش فراخوانی سلولی به محل التهاب گردد. برخی گزارشات نشان می دهد که ویتامین D3 سبب کاهش تولید IFN-γ و IL-2 می شود (20). این سیتوکاینها در تکثیر سلولی نقش دارند و کاهش این سیتوکاین ها باعث کاهش تکثیر سلولی در محل التهاب می شود(21، 22).

برخی گزارشات حاکی از آن است که ویتامین D_3 با القا آپوپتوز در تعدیل پاسخهای ایمنی نقش دارد(7). یکی از دلایل کاهش ارتشاح سلولی به مغز در موشهای تحت درمان با ویتامین D_3 ممکن است ناشی از افزایش آپوپتوز سلولهای ارتشاح یافته به بافت مغزی باشد. این احتمال را نیز می توان مطرح نمود که ویتامین D_3 ممکن است با تأثیر بر روی سد خونی ـ مغزی و افزایش پایداری این سد، سبب کاهش ارتشاح سلولی گردد. در هر صورت مکانیسم دقیق ویتامین D_3 در مهار بیماری EAE و کاهش ارتشاح سلولی مشخص نیست و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

در مجموع ویتامین D_3 با کاهش ارتشاح سلولی به بافت مغز از پیشرفت بیماری EAE جلوگیری می کند و باعث تأخیر در شروع بیماری و کاهش شدت بیماری می شود. به نظر می رسد که ویتامین D_3 بتواند در درمان بیماریهای التهابی از جمله مولتیپل اسکلروزیس که با ارتشاح سلولی به داخل بافت همراه است، مفید باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد که بدینوسیله از زحمات همه همکاران محترم آن معاونت و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می نماییم.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

References

1. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. Brain Pathol. 2005; 15(3): 217-22
2. Hemmer B, Cepok S, Zhou D, Sommer N. Multiple sclerosis a coordinated immune attack across the blood brain barrier. Curr Neurovasc Res. 2004; 1(2): 141-50
3. Zhao C, Fancy SP, Kotter MR, Li WW, Franklin RJ.Mechanisms of CNS remyelination the key to therapeutic advances. J Neurol Sci. 2005 15; 233(1-2): 87-91
4. Schwarz S, Leweling H. Multiple sclerosis and nutrition. Mult Scler. 2005; 11(1): 24-32
5. Ebers GC, Sadovnick AD, Veith R. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology. 2004; 63(5): 939
6. Ponsonby AL, Lucas RM, Van der Mei IA. A potential role for UVR and Vitamin D in the induction of Multiple Sclerosis, Type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis.Photochem Photobiol. 2005 Feb 1; [Epub ahead of print]
7. Spach KM, Hayes CE. Vitamin confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. J Immunol. 2005; 175(6): 4119-26
8. Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1, 25- dihydroxyvitamin leads to early effects within the central nervous system. Acta Neuropathol (Berl). 2003; 105(5): 438-48
9. May E, Asadullah K, Zugel U. Immunoregulation through 1, 25-dihydroxyvitamin and its analogs. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004; 3(4): 377-93
10. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J. 2001; 15(14): 2579-85
11. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, et al. Gene expression analysis suggests that 1, 25-dihydroxyvitamin reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. Physiol Genomics. 2004; 18(2):141-51
12. Hahn HJ, Kuttler B, Mathieu C, Bouillon R. 1, 25- Dihydroxyvitamin reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro. Transplant Proc. 1997 Jun; 29(4): 2156-7
13. Cantorna MT, Humpal-Winter J, DeLuca HF. In vivo upregulation of interleukin-4 is one mechanism underlying the immunoregulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3). Arch Biochem Biophys. 2000; 377(1): 135-8
14. Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Tse HY, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing-remitting EAE in H-2b/s mice. J Neuroimmunol. 2003; 136(1-2): 34-45
15. Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG (35-55) peptide in C57BL6/J strain of mice. J Autoimmun. 2003; 20(1): 51-61
16. Lemire JM, Archer DC. 1, 25-dihydroxyvitamin prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis.J Clin Invest. 1991 Mar; 87(3): 1103-7

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]

17. Frosch MP, Anthony DC, De Girolami U. The central nervous system. In; Kumar V, Abbas AK, Fausto N. editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Saunders. 2005: 1347-420
18. Chan K and Lowe J. Techniques in neuropathology. In: Bancroft JD, Gamble M. editors. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. 2002: 371-414
19. Lemire J. 1, 25-Dihydroxyvitamin a hormone with immunomodulatory properties. Z Rheumatol. 2000; 59 Suppl 1: 24-7
20. Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). Eur J Immunol. 2000 Feb; 30(2): 498-508
21. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. 1, 25-dihydroxyvitamin is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. J Immunol. 1998 Jun 1; 160 (11): 5314-9
22. Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, Furtado G, Chen X, Yan SF, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. Nat Med. 2003; 9(3): 287-93

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2025-12-05]